

## Cuantificación de proteínas: una revisión

Humberto García Arellano  
y Rafael Vázquez Duhalt

Instituto de Biotecnología UNAM  
Apartado postal 510-3, 62250, Cuernavaca, Morelos. México

### Introducción

**S**in duda alguna una de las determinaciones más usadas en biotecnología es la cuantificación de proteínas. Estimar la concentración de proteína es necesario no solo en los laboratorios de investigación, sino también en la industria alimenticia, farmacéutica y biotecnológica en general. Existen muchos métodos para la determinación de proteínas (Tabla 1). El antiguo método de Kjeldahl se basa en la determinación del nitrógeno total de la muestra. Las proteínas son digeridas en un medio ácido y el nitrógeno total determinado por titulación. Existen otros métodos muy sencillos y poco específicos, como la absorbancia de las soluciones de proteína en la región

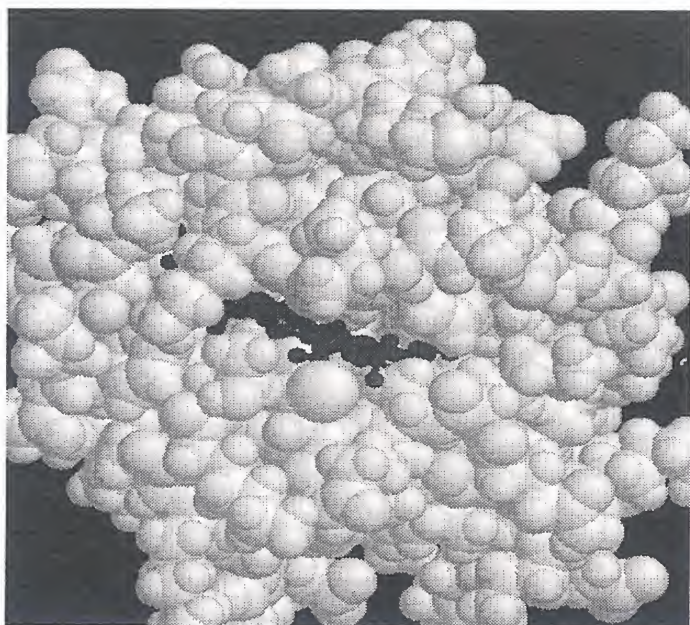
de la radiación ultravioleta. Los enlaces peptídicos absorben a 205-210 nm, mientras que los triptofanos y tirosinas lo hacen a 280 nm. Los coeficientes de extinción varían de acuerdo a la proteína, así, para la albúmina de suero bovino el coeficiente de extinción a 280 nm es  $1\% \epsilon_{280} = 6.3$ , mientras que para la inmunoglobulina de ratón  $1\% \epsilon_{280} = 13.8$ . Aunado a este problema, muchas sustancias no proteicas absorben fuertemente en la región del ultravioleta, produciendo grandes interferencias. Este es el caso de los ácidos nucleicos.

El uso del método adecuado depende de cinco criterios: 1) la cantidad total de proteína presente en la muestra, 2) la concentración de la proteína, 3) la especificidad del método, 4) la presencia de otras sustancias que pudieran interferir y 5) la facilidad y reproducibilidad del método.

En el presente trabajo se describen detalladamente algunos métodos para la cuantificación de proteínas.

### Cuantificación de proteína por el método de Lowry<sup>2</sup>

La cuantificación de proteína con cobre y el reactivo Folin es un método sensible que no requiere digestión previa. Es mucho más sensible y específica que la





**Tabla 1.** Comparación de reactivos para detectar y cuantificar proteínas en solución<sup>1</sup>

Ensayo	Longitud de onda para detección (nm) <sup>a</sup>	Sensibilidad y rango efectivo de aplicación	Mecanismo de acción	Notas
Ensayo Nano Orange	485/590	10 ng/ml a 10 µg/ml	Se une a detergentes en la superficie de las proteínas y a regiones hidrofóbicas de las proteínas; el colorante no reaccionante no presenta fluorescencia.	Alta sensibilidad. Variación proteína a proteína mínima. Ensayo rápido y preciso con un único ensayo. Compatible con agentes reductores.
Ensayo de Bradford (Azul brillante de Coomassie)	595	1 µg/ml a 1.5 mg/ml	Reacciona directamente con aminoácidos específicos y estructuras terciarias de la proteína; el colorante cambia de café a azul.	Gran variación proteína a proteína. No compatible con detergentes. Ensayo rápido. Util cuando la precisión no es muy importante
Método BCA (Ácido bicinonínico)	562	0.5 µg/ml a 1.2 mg/ml	El Cu <sup>+2</sup> es reducido a Cu <sup>+</sup> en presencia de proteínas a pH elevado; el ácido bicinonínico quela a iones de Cu <sup>+</sup> formando complejos color púrpura.	Compatible con detergentes, caótrofos y solventes orgánicos. No compatible con agentes reductores. Las muestras deben ser leídas dentro de un intervalo de 10 min.
Ensayo de Lowry (Reactivos Biuret y Folin-Ciocalteu)	750	1 µg/ml a 1.5 mg/ml	El Cu <sup>+2</sup> es reducido a Cu <sup>+</sup> en presencia de proteínas a pH elevado; el reactivo Biuret quela a iones de Cu <sup>+</sup> y el reactivo Folin-Ciocalteu potencia el color azul.	Procedimiento lento. No compatible con detergentes o agentes reductores.
Ensayo cuantitativo CBQA	450/550	10 ng/ml a 150 µg/ml	Reacciona con grupos amino primarios en presencia de cianuro o tioles; el colorante no reaccionante no presenta fluorescencia	La sensibilidad depende del número de aminos presentes. Reacciona con otras aminos primarias. No compatible con buffers que contengan aminos o tioles.
Fluorescamina	390/475	0.3 µg/ml a 13 µg/ml	Reacciona con grupos amino primarios; el colorante no reaccionante no presenta fluorescencia	La sensibilidad depende del número de aminos presentes. No compatible con buffers que contengan Tris o glicina. El reactivo es inestable.
OPA (o-ftaldehido)	340/455	0.2 µg/ml a 25 µg/ml	Reacciona con grupos amino primarios en presencia de β-mercaptoetanol; el colorante no reaccionante no presenta fluorescencia	La sensibilidad depende del número de aminos presentes. No compatible con buffers que contengan Tris o glicina. Su costo es bajo.
Absorción UV	205 280	10 µg/ml a 50 µg/ml 50 µg/ml a 2 mg/ml	Absorción del enlace peptídico. Absorción de tirosinas y triptofano	La sensibilidad depende del número de aminoácidos aromáticos presentes. No es destructivo. Su costo es bajo.

<sup>a</sup>Máxima longitud de onda de emisión/exitación de onda de de absorbancia en nm.

determinación por absorción en el ultravioleta a 280 nm, así como relativamente sencilla y fácil de adaptar a análisis en pequeña escala. Sin embargo, la cantidad de color producido varía con diferentes proteínas y en algunos casos el color no es estrictamente proporcional a la concentración.

## Principio

Existen dos pasos que llevan al desarrollo de color en las proteínas, la reacción con cobre en álcali y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por el complejo proteína-cobre.

El color natural de las proteínas en ausencia de cobre puede ser enteramente atribuido al contenido de tirosinas y triptofano.<sup>3,4</sup> Sin embargo, en presencia de cobre, el tratamiento alcalino de las proteínas resulta en un incremento de 3 a 15 veces en el desarrollo del color.<sup>4,5</sup> La reacción con cobre toma de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, pero el calentamiento a 100° C o el aumento en la concentración de álcali acelera la reacción con cobre en solución alcalina. Se requiere muy poco cobre para obtener un color final completo. Cuando el reactivo Folin es adicionado a la proteína tratada con buffer a pH 10 se obtiene un color máximo debido a la reducción del mismo por el complejo proteína-cobre. El cambio en la absorbancia

producido por la reducción del reactivo Folin es monitoreado a 750 nm.

## Interferencias

Reactivos como el ácido úrico, guanina y xantina reaccionan con el reactivo Folin, produciendo interferencias. La guanina produce 50% más color, peso por peso, que la proteína a ser probada. La mayoría de los fenoles, excepto los nitrofenoles reducen al reactivo, debido a esto, el timol y el ácido sulfosalicílico interfieren, mientras que el ácido pícrico arriba de 0.1% es permisible. La glicina al 0.5% disminuye el color con la proteína en un 50%, mientras que la hidrazina a más de 0.5% incrementa el blanco. El sulfato de amonio a una concentración final arriba de 0.15% retarda la aparición de color, esto es debido en parte a la disminución en alcalinidad, pero puede ser tolerado a concentraciones superiores a 0.25% si se adiciona una cantidad equivalente de álcali a la muestra.<sup>2</sup>

## Procedimiento

### Reactivos.

Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1N.

Reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en tartrato de sodio y potasio al 1%.

**Tabla 2.** Reactivos compatibles con el ensayo de Lowry<sup>2</sup>

Urea 0.5%	Acido tricloroacético 0.5% neutralizado
Guanidina 0.5%	Alcohol etílico 5%
Tunstanato de sodio 0.5%	Eter 5%
Sulfato de sodio 1%	Acetona 0.5%
Nitrato de sodio 1%	Sulfato de zinc 0.1%
Acido perclórico 0.5% neutralizado	Hidróxido de bario 0.1%



Reactivo C: solución alcalina de cobre, mezclar 50 ml de reactivo A con 1 ml de reactivo B; esta solución debe ser preparada al momento de uso.

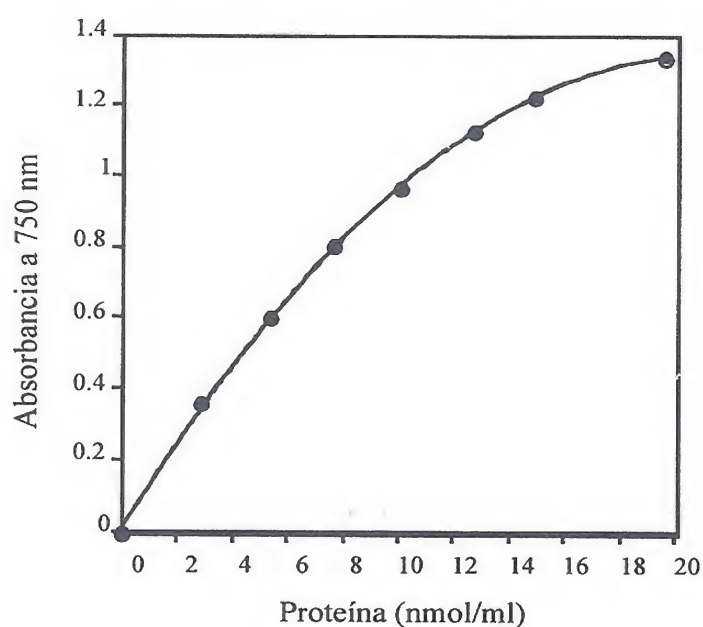
Reactivo D: solución de carbonato de cobre, es la misma que el reactivo C pero omitiendo al NaOH; es utilizada para cuantificar proteínas insolubles.

Reactivo E: Reactivo Folin diluido a 1N en ácido.<sup>2</sup>

#### *Cuantificación de proteínas en solución.*

1. Pipetear en tubos de ensayo muestras que contengan de 5 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína en 0.2 ml o menos.
2. Adicionar 1 ml de reactivo C, mezclar bien y dejar 10 min o más a temperatura ambiente.

**Figura 1.** Curva estándar de citocromo (corazón de caballo) por el método Lowry.



3. Adicionar rápidamente 0.1 ml de reactivo E, mezclar en vortex durante 2 segundos y dejar durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Leer absorbancia. Para concentraciones finales de proteína de 5 a 25  $\mu\text{g/ml}$ , la lectura puede hacerse a 750 nm. Para soluciones más concentradas la absorbancia puede leerse a 500 nm.

*Cuantificación de proteínas insolubles.* Esta metodología no es general, pero puede ser útil en algunos casos de precipitados ácidos de proteínas.

1. Adicionar 0.1 ml de NaOH 1N a 5-100  $\mu\text{g}$  de proteína precipitada. Para muestras más grandes puede ser necesario calentar por 10 min. o más a 100 °C en álcali 1N. Esto puede disminuir las lecturas, pero éstas son muy reproducibles.
2. Después de 30 minutos o más, adicionar 1 ml de reactivo D y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Adicionar 0.1 ml de reactivo E, mezclar en vortex durante 2 segundos y dejar durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Leer absorbancia a 750 nm para concentraciones finales de proteína de 5 a 25  $\mu\text{g/ml}$  o a 500 nm para soluciones más concentradas.

#### **Cuantificación de proteína por el método de Bradford<sup>6</sup>**

Este método involucra la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm y se monitorea midiendo el incremento en la absorción a 595 nm. El ensayo es muy reproducible y rápido, puede ser empleado para procesar un gran número de muestras y es adaptable a la automatización.

**Tabla 3.** Efecto de varios reactivos en la formación del complejo Azul Brillante de Coomassie G-250-proteína<sup>6</sup>.

Reactivo <sup>a</sup>	Cambio en OD 595 nm	(μg) Equivalentes de BSA
1 M KCl	0.000	0.00
5 M NaCl	0.000	0.00
1 M MgCl <sub>2</sub>	0.000	0.00
2 M Tris	0.026	2.34
0.1 M EDTA	0.004	0.36
1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.000	0.00
99% Glicerol	0.012	1.08
1 M 2-Mercaptoetanol	0.004	0.36
1 M Sacarosa	0.013	1.17
95% Etanol	0.000	0.00
Acetona	0.069	6.21
5% Fenol	0.046	4.14
0.1% Triton X-100	0.013	1.17
1% Triton X-100	0.590	53.10
0.1% SDS	0.011	0.99
1% SDS	0.495	44.55
0.1% Hemosol	0.004	0.36
1% Hemosol	0.108	9.72

<sup>a</sup>Los valores anteriores fueron obtenidos cuando se agregó 0.1 ml de cada sustancia al ensayo.

## Principio

El método está basado en la observación de que el colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 presenta dos formas coloreadas, azul y rojo.<sup>7</sup> El color rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína.<sup>7</sup> La formación del complejo colorante-proteína toma aproximadamente 2 minutos y permanece estable por 1 hora, por lo que el procedimiento es muy rápido y el tiempo para el ensayo no es limitante.

El complejo colorante-proteína tiene un alto coefi-

ciente de extinción, lo que hace al ensayo aproximadamente cuatro veces mas sensible que el ensayo de Lowry.

## Interferencias

Buffers altamente alcalinos presentan interferencia, pero puede ser contrarrestada corriendo blancos apropiados. Reactivos como cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, etanol y sulfato de amonio no tienen efecto sobre el ensayo. Otros reactivos como Tris, ácido acético, 2-mercaptoetanol, sacarosa, glicerol, EDTA y trazas



de los detergentes Triton X-100, dodecil sulfato de sodio (SDS) y Hemosol tienen ligeros efectos que pueden ser fácilmente eliminados preparando buffers adecuados. La presencia de grandes cantidades de detergentes presenta una gran interferencia.

## Procedimiento

El ensayo es muy reproducible y rápido, con el desarrollo completo de color en un intervalo de 2 minutos y una estabilidad de aproximadamente 1 hora.

### Microensayo

1. Preparación de reactivo. Disolver 100 mg del Colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. Adicionar a esta solución 100 ml de ácido fosfórico al 85% (w/v). Diluir la solución resultante a 1 litro. Las concentraciones finales en el reactivo son: Azul Brillante de Coomassie G-250 0.01% (w/v), etanol

- 4.7% (w/v), ácido fosfórico 8.5% (w/v).<sup>7</sup>
2. Pipetear en tubos de ensayo soluciones de proteína que contengan de 10 a 100 mg de proteína.
3. Ajustar el volumen a 0.1 ml con el buffer apropiado.
4. Agregar un mililitro del reactivo Azul Brillante de Coomassie G-250 preparado como se describe anteriormente.
5. Mezclar en vortex y leer absorbancia a 595 nm después de 2 minutos de agregar el colorante y antes de 1 hora de iniciada la reacción.

## Cuantificación de proteína por el método BCA<sup>8</sup>

La determinación de proteína por BCA es un método altamente sensible.<sup>8</sup> Este método combina la reacción de las proteínas con  $\text{Cu}^{+2}$  en un medio alcalino (produciendo  $\text{Cu}^{+}$ ) con un reactivo para la detección de  $\text{Cu}^{+}$  altamente selectivo y sensitivo denominado ácido bicinconínico.

Este ensayo muestra menos variación de una proteína a otra. La variabilidad es similar a aquella obtenida con el método de Lowry, pero puede ser reducida efectuando el ensayo a 60°C por 30 minutos (procedimiento mejorado).

### Principio

El ácido bicinconínico (BCA), en la forma de su sal de sodio soluble en agua, es un reactivo altamente sensible y específico para el ión  $\text{Cu}^{+}$ . Se ha reportado que la estructura macromolecular de la proteína y cuatro péptidos específicos (cisteína, cistina, triptofano y tirosina) son los responsables de la formación de color en muestras de proteína cuando son ensayadas con BCA.<sup>9</sup>

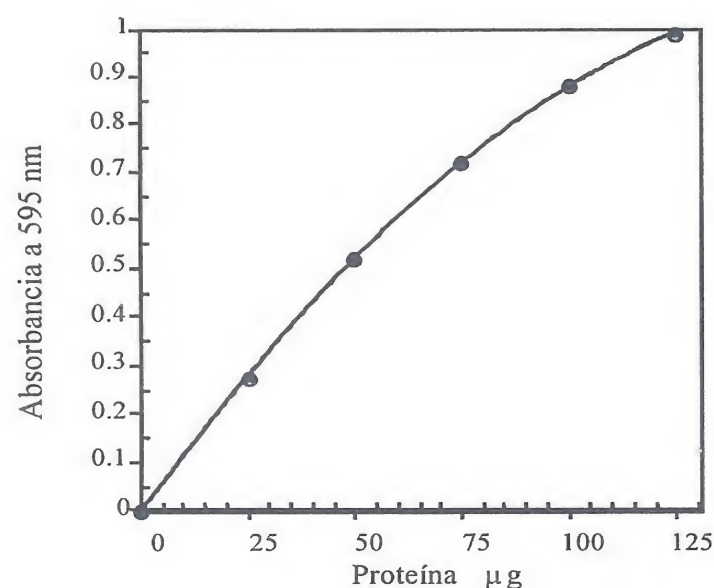


Figura 2. Curva estándar de Albumina de suero bovino (BSA) por el método de Bradford.

**Tabla 4.** Reactivos compatibles con el ensayo BCA.

Detergentes	Buffers/sales	Otros reactivos
Triton X-100 1%	0.1M Tris <sup>a</sup>	0.1 N HCl
SDS 1%	0.1M Fosfato de sodio	0.1 N NaOH
Brij 35 1%	0.1M Bicarbonato de sodio	10 mM EDTA <sup>b</sup>
Lubrol PX 1%	1.0M Cloruro de sodio	3.0 M Urea
CHAPS 1%	1.0 M Glicina pH 11 <sup>a</sup>	40% Sacarosa <sup>c</sup>
CHAPSO 1%	0.2 M Acetato de sodio pH 5.5	0.2% Azida de sodio
Octil glucósido 1%	0.1M Asparagina pH 7.25	10 mM Glucosa <sup>c</sup>
Triton X-114 1%	0.1M Bicarbonato de cesio	1 mM DTT <sup>d</sup>
Nonidet NP-40 1%	0.1M HEPES pH 7.25	1 mM DTE <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Buffers de Tris a concentraciones superiores de 0.1 M *pueden* usarse efectivamente si se ajusta el pH a 11.0 - 11.25. Los buffers de glicina *deben* ajustarse a pH 11.0 - 11.25 para evitar errores serios en la determinación.

<sup>b</sup>EDTA (a concentraciones superiores a 10 mM) y otros agentes quelantes fuertes pueden disminuir los iones disponibles de cobre necesarios para el ensayo reduciendo la sensibilidad del mismo.

<sup>c</sup>Los azúcares reductores pueden causar error si los tiempos de incubación y la temperatura son elevados. La sacarosa y la glucosa, siendo reductores débiles, resultan en una ligera absorbancia, pero los resultados lineales pueden ser mantenidos aunque la sensibilidad del ensayo puede verse reducida.

<sup>d</sup>Los agentes reductores como DTT y DTE, resultan en altas interferencias que reducen la sensibilidad del ensayo. Se ha encontrado que los siguientes compuestos interfieren en el método estandar resultando en blancos excesivamente altos: 0.01% Thimerosal, 1.0 % Mercaptoetanol y Ácido ascórbico 0.1 M.

La cuantificación por BCA combina la reacción de Biuret (reacción de la proteína con  $\text{Cu}^{+2}$  en un medio alcalino para producir  $\text{Cu}^+$ ). El producto de la reacción presenta un color púrpura, formado por la interacción de dos moléculas de BCA con el ión  $\text{Cu}^+$ , es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. Esto permite la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa.

## Interferencias

Este ensayo esta tamponado a un pH óptimo de

11.25. Cualquier reactivo en la muestra que disminuya el pH de la formulación a menos de 11 o lo eleve a más de 11.5 puede afectar la sensibilidad o reproducibilidad del ensayo. En muchos casos, ajustar el pH de la muestra a 11 antes de realizar la determinación puede evitar variaciones.

El reactivo BCA tiene gran tolerancia a compuestos que se encuentran rutinariamente en soluciones de proteína. Un caso particular es la ausencia de interferencias en concentraciones relativamente altas (1%) de detergentes iónicos y no iónicos. Los reactivos listados en la tabla 4, han sido probados

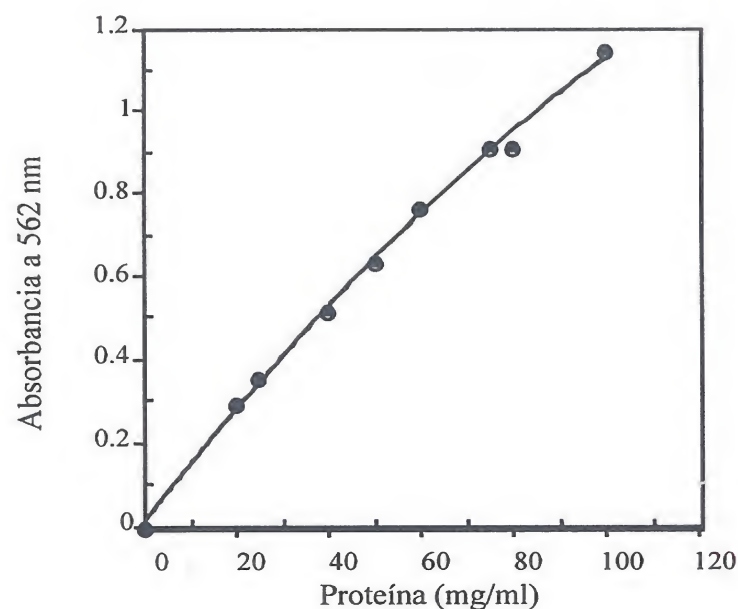


con una solución de proteína de 500 mg/ml de BSA con el método estándar (37 °C/30 min). Las concentraciones listadas para cada reactivo no interfieren con el ensayo (error relativo menor al 3%).

## Protocolos

El ensayo de proteína por el método de BCA es flexible y permite elegir el mejor procedimiento para una situación dada. Es posible incrementar la sensibilidad del ensayo aumentando el tiempo de incubación, aumentando la temperatura de incubación, o ambos. La estabilidad del color después de enfriar a temperatura ambiente es suficiente para permitir las lecturas de absorbancia de múltiples muestras.

**Procedimiento estándar.** Rango aplicable de concentración de proteína = 20 - 1200 µg/ml. Este protocolo proporciona excelente sensibilidad de cerca de 0.012 Unidades de Absorbancia (UA)



**Figura 3.** Curva estándar de BSA por el método del ácido bicinonínico (BCA).

por microgramo (µg) de proteína combinado con un rápido análisis. Temperatura = 37 °C; Tiempo = 30 min.

**Procedimiento a temperatura ambiente.** Rango aplicable de concentración de proteína = 20 - 1200 mg/ml. El desarrollo del color procederá normalmente a temperatura ambiente. Después de 2 horas a esta temperatura, la sensibilidad es de 0.010 (UA)/µg de proteína. Después de 21 horas, la sensibilidad se duplica. Temperatura = ambiente; Tiempo = 2 horas.

**Procedimiento mejorado.** Rango aplicable de concentración de proteína = 5 - 250 µg/ml. Este protocolo es aplicable para aquellas situaciones donde se espera que la concentración de las muestras sea baja o si se desea emplear solo una pequeña cantidad de muestra. La sensibilidad es excelente cerca de 0.032 (UA)/µg de proteína. Temperatura = 60°C; Tiempo = 30 minutos.

## Procedimiento

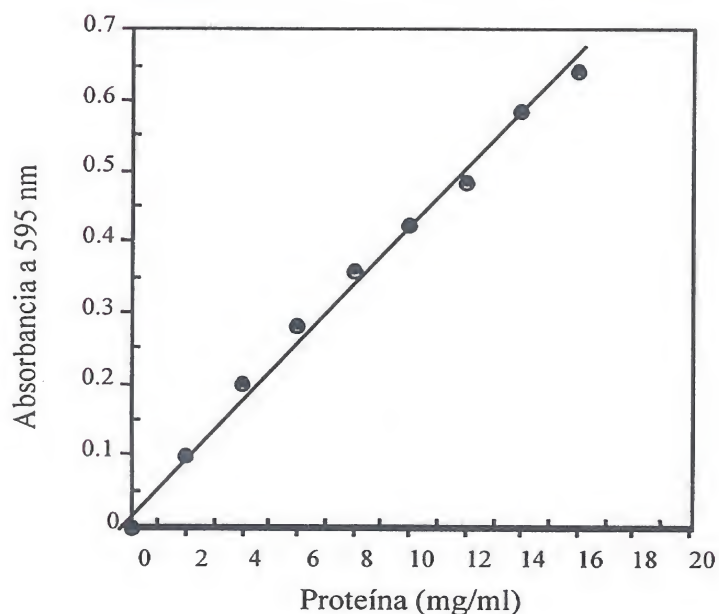
Debido a que la relación de colorante a volumen de la muestra es la misma, todas las técnicas son idénticas excepto por los tiempos y temperaturas de incubación.

1. Preparación del reactivo de trabajo. Mezclar 50 partes del "reactivo A" con una parte del "reactivo B" (Pierce BCA catálogo No. 23225). Reactivo A: contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, reactivo BCA para detección y tartrato de sodio en una solución de NaOH 0.2 N.  
Reactivo B: solución de sulfato de cobre 4%.
2. Preparar un grupo de estándares de proteínas de concentración conocida, diluyendo la pro-



teína a ensayar en el mismo diluyente de las muestras desconocidas. El grupo de estándares de proteína debe cubrir el rango de concentraciones indicadas en el protocolo a seguir.

3. Pipetear 0.1 ml de cada estándar o muestra de concentración desconocida en tubos previamente marcados. Para blancos, utilizar 0.1 ml de diluyente.
4. Adicionar 2.0 ml de reactivo de trabajo a cada tubo y mezclar en vortex.
5. Incubar todos los tubos a la temperatura y tiempo seleccionados.  
Procedimiento estándar: 37 °C; 30 minutos.  
Procedimiento a temperatura ambiente: temperatura ambiente; 2 horas.  
Procedimiento mejorado: 60 °C; 30 minutos.
6. Después de la incubación, enfriar todos los tubos a temperatura ambiente.
7. Medir la absorbancia a 562 nm.



**Figura 4.** Curva estándar de BSA por el método de Bio-Rad (microensayo).

## Determinación de proteína por Bio-Rad

Este ensayo, basado en el método de Bradford, es un procedimiento simple y preciso para la determinación de la concentración de proteínas solubles. Involucra la adición de un colorante ácido a una solución de proteína y la subsecuente medición a 595 nm con un espectrofotómetro o un lector de microplatos. La comparación con una curva estándar proporciona una medida relativa de la concentración de proteína.

### Principio

La cuantificación de proteína por Bio-Rad consiste en un cambio diferencial de color en respuesta a varias concentraciones de proteína<sup>6</sup>. El máximo de absorbancia para una solución ácida del colorante azul brillante de Coomassie G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se une a la proteína<sup>7,10,11</sup>. El colorante azul de Coomassie reacciona principalmente con residuos de amino ácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina<sup>12</sup>. Spector<sup>13</sup> encontró que el coeficiente de extinción molar de una solución de complejo albúmina-colorante era constante sobre un amplio rango de concentraciones. De esta forma, la *Ley de Lambert y Beer* puede aplicarse para la cuantificación precisa de proteína seleccionando una relación apropiada de volumen de colorante a concentración de la muestra.

### Interferencias

Las interferencias con este ensayo pueden ser ocasionadas por interacciones químicas con la proteína o por interacciones químicas con el colorante (condiciones alcalinas o detergentes interfieren con este ensayo). A continuación se enlistan reactivos

**Tabla 5.** Reactivos compatibles con el ensayo Bio-Rad (procedimiento estándar).

Acetona	Fenol 5%	Mercaptoetanol 1 M	rRNA 0,25 mg/ml
Aminoácidos	Fosfatos 1 M	Metanol	tRNA 0,4 mg/ml
Ditiotreitol 1M	Glicerol 99%	NaCl 5 M	SDS 0,1%
Etanol	Glucosa	Peptonas	Triton X-100 0.1%
Fructosa	KCl 1 M	pH ácido	Urea 6 M

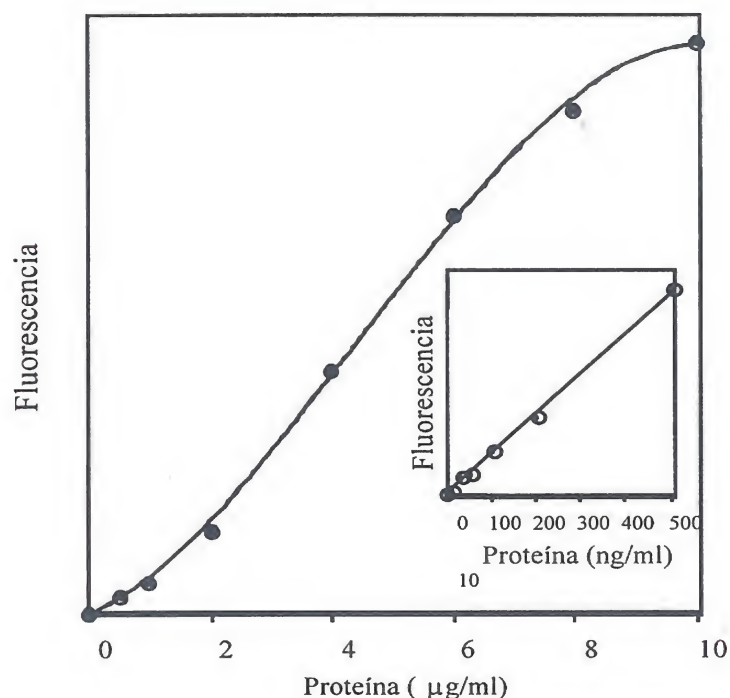
y agentes químicos que no interfieren con este ensayo.

Algunos de estos reactivos pueden causar interferencias en combinación con ciertas proteínas, sin embargo, con respecto a proteínas tales como albúmina de suero bovino y globulina, los agentes listados muestra poca o nula interferencia. Las concentraciones equivalentes de estos reactivos para el microensayo corresponden a 1/40 de las

listadas en la tabla 5, esto se debe a la diferencia en la relación muestra a reactivo entre el procedimiento estándar y el microensayo.

### Procedimiento (microensayo)

1. Preparar 3 o 5 diluciones de una solución estándar de proteína, las cuales deben ser representativas de la solución que va a ser analizada. El rango lineal para BSA es 1.2 a 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que para IgG el rango lineal va de 1.2 a 25  $\mu\text{g/ml}$ .
2. Adicionar 800  $\mu\text{l}$  de cada muestra estándar en tubos de ensayo. Las soluciones de proteína son normalmente ensayadas en duplicado o triplicado.
3. Adicionar 200  $\mu\text{l}$  del colorante reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio Rad Catálogo No. 500-0006) a cada tubo y agitar en vortex.
4. Incubar a temperatura ambiente por al menos 5 minutos. La absorbancia incrementa con el tiempo por lo que las muestras deben incubarse a temperatura ambiente por no más de 1 hora.
5. Medir la absorbancia a 595 nm.



**Figura 5.** Determinación de proteína BSA utilizando el método Nano Orange. El recuadro corresponde al área marcada en la esquina inferior izquierda de la gráfica (0 a 500 ng de proteína por ml) e ilustra el límite de detección de 10 ng/ml.

### Cuantificación de proteína por el método Nano Orange

Los métodos reportados por Lowry<sup>2</sup> y Bradford<sup>6</sup>, así como el ensayo descrito por Smith, que utiliza ácido bicinonínico (BCA)<sup>8</sup>, son pruebas basadas



en medidas de absorción, lo que hace a estos métodos limitados en sensibilidad y rango efectivo de análisis. El método Nano Orange permite un ensayo de alta sensibilidad para la determinación de proteínas en solución.

## Principio

La interacción de la proteína con el reactivo diluido produce un gran aumento en la fluorescencia que puede ser empleado para generar una curva estándar para la determinación de proteína mediante su lectura a 485/590 nm. La fluorescencia del reactivo en ausencia de la proteína es despreciable.

El ensayo de Nano Orange puede detectar proteí-

na a concentraciones finales de 10 ng/ml cuando se utiliza un espectrofluorómetro estándar o un minifluorómetro equipado con filtro. Un sólo ensayo es suficiente para cuantificar concentraciones de proteína entre 10 ng/ml y 10 µg/ml, un intervalo de tres órdenes de magnitud.

En contraste con los métodos de Bradford y BCA, el ensayo con el reactivo Nano Orange y su complejo con la proteína presentan gran estabilidad química. De esta forma, la cuantificación puede efectuarse hasta seis horas después de la preparación de la muestra sin pérdida de señal, considerando que las muestras se encuentran protegidas de la luz. Otra ventaja que presenta este método es una menor variación de proteína a proteína en la cuantificación.

**Tabla 6.** Niveles de tolerancia para contaminantes en el método Nano Orange para cuantificación de proteína.<sup>1</sup>

Glicerol	10% por volumen
Polietilenglicol (PEG)	1% por volumen
Urea	1 M
Ditiotreitol (DTT), β-mercaptoetanol	100 mM
KCl, NaCl, acetato de sodio, fosfato de sodio	20 mM
Sulfato de amonio, ácido ascórbico, buffer-HEPES, HCl, NaOH, azida de sodio, sacarosa.	10 mM
EDTA	5 mM
Cloruro de calcio, cloruro de magnesio	1mM
Amino ácidos	100 µg/ml
DNA	100 ng/ml
Dodecil-sulfato de sodio (SDS)	0.01%
Tween 20, Triton X-100	0.001%

<sup>a</sup>Los compuestos presentes en la solución final a ensayar a concentraciones iguales o menores a las indicadas no interfieren apreciablemente con la determinación. Siempre que sea posible, el blanco y estándares de proteína deberán ser preparados en soluciones a condiciones similares a aquellas de las muestras experimentales.

## Interferencias

Este método es compatible con la presencia de agentes reductores. Además, la alta sensibilidad y estabilidad del ensayo permite la dilución de los contaminantes potenciales, incluyendo sales y detergentes. Los ácidos nucleicos no interfieren con la cuantificación.

## Procedimiento

La cuantificación de proteína es más fácil de desarrollar que otros métodos. Las muestras de proteína simplemente son adicionadas al reactivo diluido NanoOrange (Molecular Probes Catálogo No. N6666) y las mezclas son calentadas a 95 °C por 10 min. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente, sus emisiones de fluorescencia se miden directamente. La fluorescencia se mide utilizando filtros para emisión/excitación a 485/590 nm.

## Conclusiones

El mejor método para la determinación de proteínas dependerá de varios factores, unos dependen de la muestra a analizar y otros de la infraestructura con que se cuente. En todos los casos siempre se prefieren los métodos sencillos y rápidos.

La sensibilidad del método es muy importante cuando la cantidad total de la muestra es limitada o bien cuando la concentración de proteína en ella sea muy baja. La especificidad del método es importante cuando se analizan muestras de diferente naturaleza, es decir, la respuesta del método no presentará grandes variaciones dependiendo del tipo de proteína presente. De otra manera sería necesario la realización de varias curvas estándar, una para cada tipo de proteína a cuantificar. Las interferencias

al método son importantes cuando se trata de muestras no muy puras, obtenidas de medios complejos, conteniendo concentraciones elevadas de otros compuestos o a condiciones de pH o fuerza iónica especiales.

Todos los métodos presentados aquí son reproducibles y varían en la sencillez de la determinación, en la sensibilidad y en el costo. Nosotros recomendamos como el mejor método aquel que es lo suficientemente sensible para detectar las concentraciones que se tienen en las muestras, que es sencillo y rápido, y finalmente el más económico.

## Referencias

1. Haugland, R. P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes*. Sixth Edition. 1996. 180-182.
2. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
3. Folin, O. and Denis, W., *J. Biol. Chem.*, 12, 239 (1912).
4. Herriot, R. M., *J. Gen Physiol.*, 19, 283 (1935).
5. Herriot, R. M., *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, 46, 642 (1941).
6. Bradford, M. M., *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976).
7. Reisner, A. H.; Nemes, P. and Bucholtz, C., *Anal. Biochem.* 64, 509 (1975).
8. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., *Anal. Biochem.*, 150, 76-85 (1985).
9. Wiechelman, K.; Braun, R.; Fitzpatrick, J., *Anal. Biochem.*, 175, 231-237 (1988).
10. Fazekas de St. Groth, S.; Webster, R. G.; Daytner, A., *Biochim. Biophys. Acta*. 71, 377 (1963).
11. Sedmack, J. J. and Grossberg, S. E., *Anal. Biochem.* 79, 544 (1977).
12. Compton, S. J. and Jones, C. G., *Anal. Biochem.* 151, 369 (1985).
13. Spector, T., *Anal. Biochem.* 86, 142 (1978).